

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM  
POPULAÇÕES DE *Manilkara multifida* Penn. NO SUL DA  
BAHIA.**

**RAMIRIS CÉSAR SOUZA MORAES**

**ILHÉUS – BAHIA - BRASIL**

**Julho de 2012**

**RAMIRIS CÉSAR SOUZA MORAES**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Manilkara multifida* Penn. NO SUL DA BAHIA.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz, como  
parte das exigências para obtenção do título  
de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Genética e Biologia  
Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Julho de 2012**

**RAMIRIS CÉSAR SOUZA MORAES**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Manilkara multifida* Penn. NO SUL DA BAHIA.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz, como  
parte das exigências para obtenção do título  
de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Genética e Biologia  
Molecular.

APROVADA: 17 de julho de 2012

Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo  
(EMBRAPA)

Dra. Eliana Cazetta  
(UESC)

Dra. Janisete Gomes da Silva-Miller  
(UESC)

Dra. Fernanda Amato Gaiotto  
(UESC - Orientadora)

## DEDICATÓRIA

Ao eterno Emanuel,  
Ao sábio João Nagô,  
Ao meu grande amor Emile,  
Aos meus preciosos pais Carlos e Vera,  
E aos meus amados irmãos Sergio e Manuela,  
DEDICO

*“Então, aí que eu percebi que filho de Deus não tem problema, tem solução”*

*Velho Nagô*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Emanuel por sempre guiar meus passos. És a primeira pessoa em minha vida!

À minha família, principalmente aos meus pais Carlos e Vera por serem pais exemplares que me ensinaram preciosos valores. Aos meus avós Laudelino, Licota e Mãe por serem espíritos de luzes que estão sempre ao lado da nossa família transmitindo força, coragem e muito carinho..

Agradeço a minha esposa Emile por simplesmente ser a eterna Emile da minha vida. Te amo, te amo, te amo de todo o meu coração, átrio direito, aorta, miocárdio, ponte de safena, tudo que um coração pode ter.

Agradeço também à professora Fernanda Gaiotto pela orientação durante este trabalho, pela habilidade em promover o crescimento dos seus mestrandos e doutorandos, e principalmente pela amizade. Fê, não há ninguém igual a você! Possui todas as qualidades que um ser humano pode ter. Você é um exemplo para todos. Te adoro!

Ao professor Mariano por ser, em todos os momentos, professor, orientador, mateiro, cientista, violeiro, cozinheiro e grande amigo. Você é um grande amigo.

Aos meus colegas, Caio Vivas, Fernanda Ancelmo e Roberto Tarazi pelas discussões e apoio na execução dos trabalhos de campo e laboratório. Adoro vocês também, meus queridos.

Aos meus colegas de campo, Jiomário dos Santos Souza (Bila), José Lima e Alesandro, e de laboratório, Josiane, Acácia, Jeiza, Allan, Douglas, Emerson, Eullaysa, Lucas e Elaine. Vocês fizeram meus dias de “lab” mais felizes. Aos meus amigos Flor e Augusto pelas prosas e versos!

A dona Cida do pensionato pelo apoio durante esses anos e pelo café!

A Fabrícia pela paciência e pelo auxílio durante os “trâmites burocráticos”. Você é uma pessoa maravilhosa!

Às professoras Vânia Azevedo, Eliana Cazetta e Janisete Silva-Miller pelas valiosas sugestões que engrandeceram este trabalho. Excelente banca!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UESC pela luta para nos oferecer uma excelente formação.

À Veracel Celulose na pessoa de Ligia, e ao ICMBio na pessoa do Paulo Cruz, ambos pelo suporte nas atividades de campo. Grandes parceiros!

À FAPESB e a CAPES pelo suporte financeiro fundamental para a realização deste trabalho. E a todo o povo da caatinga e do Brasil que nos permite estudar com recursos provenientes de impostos que os arranca a última gota de suor.

E por que não à *Manilkara multifida*, pelas folhas, pelo DNA, pelos dados, pela beleza cênica e por resistirem até aqui a todo tipo de exploração.

Um grande abraço a todos e até o Doutorado!

*Ramiris Moraes*

## ÍNDICE

EXTRATO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. MATA ATLÂNTICA.....	3
2.1.1. Mata Atlântica no sul da Bahia.....	5
2.2. <i>Manilkara multifida</i> .....	7
2.2.1. Descrição botânica da <i>M. multifida</i> .....	9
2.3. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA.....	10
2.4. MICROSSATÉLITE .....	12
2.4.1. Origem dos microssatélites .....	12
2.4.2. Primers.....	13
2.4.3. Genotipagem.....	14
2.4.4. Aplicação dos microssatélites .....	16
3. CAPÍTULO 01: MICROSATELLITE MARKERS FOR ENDEMIC ATLANTIC FOREST TREE, <i>Manilkara multifida</i> Penn. (SAPOTACEAE) .....	17
3.1. ABSTRACT .....	18
3.2. INTRODUCTION.....	19
3.3. METHODS AND RESULTS.....	20
3.4. CONCLUSION .....	21
3.5. LITERATURE CITED .....	22
3.6. Tables .....	25
4. CAPÍTULO 02: ANÁLISES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ENTRE DIFERENTES GERAÇÕES DE <i>Manilkara multifida</i> Penn. ....	27
4.1. RESUMO .....	27
4.2. INTRODUÇÃO .....	28
4.3. MÉTODOS .....	30
4.4. RESULTADOS.....	32
4.5. DISCUSSÃO.....	33
4.6. LITERATURA CITADA .....	35
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES .....	40

## EXTRATO

Os remanescentes de Mata Atlântica localizados no sul da Bahia abrigam espécies arbóreas que sofreram com a exploração de madeira nas últimas décadas. Dentre elas encontra-se a *Manilkara multifida* que teve suas populações reduzidas pelo processo de fragmentação, perda de habitat e corte seletivo. Tais processos podem provocar, através da redução do número de indivíduos, a perda de alelos importantes para a manutenção da capacidade evolutiva das populações. O presente trabalho teve como principal objetivo analisar a perda de diversidade genética e estruturação em populações fragmentadas de *M. multifida*, através da comparação da variabilidade genética dos espécimes jovens com os adultos, os quais retratam os períodos pré e pós-fragmentação. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes. A primeira consistiu na obtenção de *primers* para regiões flangeadoras de microssatélites em *M. multifida*. Nessa fase, foi desenvolvida uma biblioteca genômica enriquecida para dinucleotídeos repetidos do tipo (CT/GT), seguida da otimização dos *primers* e caracterização dos locos. Como resultado, foram obtidos oito locos polimórficos com índices de diversidade, exclusão de paternidade e probabilidades de identificação individual, relevantes para estudos populacionais. Na segunda etapa, já de posse dos *primers*, foi realizada a genotipagem dos indivíduos amostrados em dois fragmentos de Mata Atlântica no sul da Bahia – a Reserva Biológica localizada em Una (RBU) e a RPPN Estação Veracel (EVC) em Porto Seguro. Os dados populacionais foram analisados utilizando os índices de diversidade  $H_E$  e  $H_O$ , o coeficiente de endogamia  $f$  e o índice de fixação  $\theta$  de Weir & Cockerhan.

Os resultados obtidos evidenciam a redução da variabilidade genética entre gerações de *M. multifida*. Isto é, a análise da variabilidade das plantas juvenis em ambos os fragmentos revelou-se reduzida quando comparada com as árvores adultas. Supõe-se que eventos de deriva genética e endogamia, agravados pela distribuição das populações em fragmentos de habitats perturbados, contribuíram para a diminuição da diversidade genética entre gerações. Os valores elevados do coeficiente de endogamia embasam a hipótese de que perturbações de ordem antrópica provocaram a redução do número de espécimes nas populações remanescentes. No que diz respeito à diferenciação genética entre as duas populações nos fragmentos RBU e EVC, foi observada baixa diferença genética



entre as árvores adultas. Esse resultado sugere que ambas as populações surgiram por expansão a partir de um conjunto gênico com consecutivos eventos de migração. As mesmas análises nos juvenis revelaram alta diferenciação entre populações, apontando para um possível distanciamento genético ao longo das gerações, provavelmente devido à perda de espécimes dentro dos fragmentos.

## ABSTRACT

The Atlantic Forest remnants from Southern Bahia host large tree species that suffered with timber logging in last decades. Included in this group, *Manilkara multifida* was submitted to fragmentation and habitat loss. These processes decrease the specimens number, and furthermore, conduce to loss of important alleles that could maintain the evolutionary fitness of population. With this work we aim to analyze the relationship between fragmentation and loss of genetic diversity, and genetic differentiation among *M. multifida* populations comparing genetic parameters of adult trees and juveniles, which account for the period pre and post fragmentation. For this purpose, the work was divided in two parts. The first one consisted of developing primers that flanked microsatellites regions in *M. multifida*. A genomic library was built, followed by primer optimization and characterization. We developed eight polymorphic loci with diversity, paternity exclusion and individual identity indices, which are relevant for population studies. In the second part, we applied the developed primers for genotyping sampled plants in two fragments of the Atlantic forest in Southern of Bahia – the Reserva Biológica located in Una (RBU) and the RPPN Estação Veração (EVC) in Porto Seguro. The data analysis was performed using diversity indices  $H_E$  and  $H_O$ , inbreeding coefficient ( $f$ ) and the fixation index ( $\theta$ ) of Weir & Cockerhan index.

Our results showed the reduction of genetic variability between generations of *M. multifida*, *i.e.*, the estimated variability parameters of juveniles in both fragments was low when compared to the adult trees. It is assumed that events of genetic drift and inbreeding, worsened by the distribution of populations in disturbed fragments, have contributed to the loss of genetic diversity between generations. High values of the inbreeding coefficient reinforce the hypothesis that human disturbance caused a reduction in the number of specimens in remaining populations. Concerning genetic differentiation between populations in RBU and EVC, low genetic structure was observed among adult trees. This result suggests that both populations were derived by expansion from an original gene pool with consecutive migration events. The same analyzes on juveniles showed high population differentiation, indicating a possible genetic distance over the generations, probably due to the loss of specimens within the fragments.

## 1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais são conhecidas por sua exuberância geralmente associada a árvores de grande porte formando dosséis com extensão expressiva. Entretanto, além dessa beleza cênica a diversidade desses organismos oferece uma estrutura física importante para a manutenção de outras espécies, além de influenciar diretamente na ciclagem de nutrientes, estabilização do solo, hidrologia e o microclima (Lawton, 1994). Essa diversidade também torna o ambiente mais heterogêneo e menos vulnerável a eventos estocásticos. Atualmente, grande parte desses processos ocorre em florestas reduzidas a fragmentos dentro da paisagem.

A Mata Atlântica é composta por várias formações, e isso significa que a mesma por si só forma um mosaico de fitofisionomias reduzidas a fragmentos de floresta. Inicialmente sua cobertura vegetal perfazia aproximadamente 1.500.000 Km<sup>2</sup> dentro do território brasileiro e hoje está reduzida a um conjunto de fragmentos que se mantêm entre 11,4% e 16% dentro do seu domínio (Ribeiro *et al*, 2009). Depois de reconhecida sua grande vulnerabilidade, a Mata Atlântica ganhou o *status* de *hotspot* de biodiversidade entrando no *hall* de florestas ameaçadas pelos impactos antrópicos. No atual contexto, a compreensão dos efeitos de tais perturbações sobre os processos ecológicos e evolutivos ganha importância uma vez que a Mata Atlântica se apresenta como um importante centro de endemismo com espécies ameaçadas restritas a formações locais.

Portanto, com a finalidade de compreender a influência recíproca entre ação humana e processos naturais é que estudos vêm sendo realizados com consequente importância na fundamentação de estratégias de conservação da biodiversidade (Pardini, 2004; Pardini *et al*, 2005; Oliveira *et al*, 2010). Seguindo essa perspectiva, torna-se evidente a importância de integrar a esses conhecimentos uma abordagem genética com o objetivo de ampliar a compreensão de processos ecológicos e evolutivos. Por exemplo, a abordagem genética populacional permite fazer inferências a respeito da conectividade entre fragmentos florestais, através da análise de populações geneticamente distintas. Neste caso, as análises baseadas em frequência genotípica contribuem para as discussões ecológicas no âmbito de paisagens fragmentadas.

Desta forma, lançando mão de ferramentas moleculares, o presente trabalho manteve o foco na análise da variabilidade genética em arbóreas inseridas no

contexto de pré e pós-fragmentação. Tendo como hipóteses: i) há maior variabilidade entre as plantas estabelecidas no período anterior à fragmentação e ii) árvores longevas em fragmentos diferentes possuem menor diferença genética entre si, o mesmo não sendo verdadeiro para a prole recentemente estabelecida.

*M. multifida* foi utilizada como modelo biológico por apresentar árvores longevas que hipoteticamente contemplam esses dois períodos (pré e pós fragmentação).

Portanto, os objetivos desse trabalho foram: i) desenvolver marcadores microssatélites como ferramenta para auxiliar na obtenção de dados genéticos; ii) analisar a diversidade genética e endogamia em grupos de *Manilkara multifida* considerados adultos e jovens e iii) estimar a estrutura genética entre populações considerando os dois grupos citados anteriormente.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MATA ATLÂNTICA

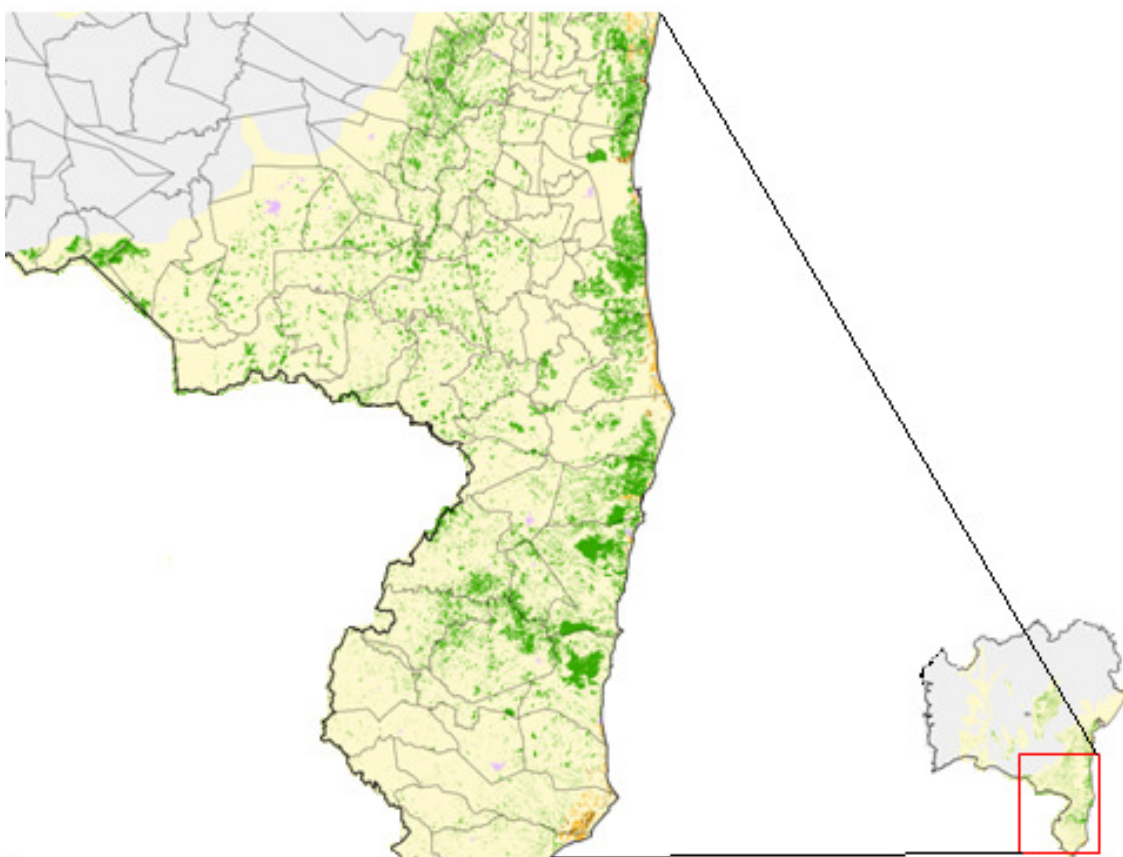
A Mata Atlântica é constituída por um complexo de fitofisionomias (Coutinho, 2006) onde se encontram cerca de 2,7% das plantas endêmicas, além de 2,1% dos vertebrados (Myers, 2000). Essas espécies distribuem-se de forma heterogênea em sub-regiões biogeográficas (Silva & Casteleti, 2003). Segundo o mapa da área de aplicação da Lei da Mata Atlântica proposto pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – várias formações são encontradas no seu domínio – Florestas Ombrófilas Densa, Mista e Aberta, Florestas Estacionais Decidual e Semidecidual, brejos interioranos, savana, savana-estépica, estepe, áreas das formações pioneiras, áreas de tensão ecológica e refúgios vegetacionais. São reconhecidas 15.782 espécies de plantas no Domínio Atlântico, sendo 7.155 endêmicas e dentre essas 80% são de Florestas Ombrófilas Densas (Stehmann *et al*, 2009).

A Mata Atlântica é considerada uma das maiores florestas tropicais das Américas com uma área original de aproximadamente 1.500.000 km<sup>2</sup>. No entanto, várias transformações ocorreram no seu domínio desde os primeiros períodos da colonização europeia (Galindo-Leal & Câmara, 2003). Hoje sua cobertura vegetal encontra-se entre 11,4% e 16% da área original (Ribeiro *et al*, 2009). Essa redução é atribuída aos processos de fragmentação e perda de habitat que contribuíram para a diminuição de suas áreas originais.

De acordo com Fahrig (2003), a fragmentação resulta em alterações na configuração do habitat e implica em efeitos como aumento do número de manchas e do isolamento. Na maioria das vezes, esse processo exerce influência direta no fluxo gênico entre populações alocadas em paisagens fragmentadas. Entretanto, os efeitos da fragmentação propriamente dita podem ser mitigados pela conectividade entre os fragmentos (Pardini *et al*, 2005). Isso leva em conta a interação que cada espécie mantém com a estrutura da matriz. Em primatas, por exemplo, o fluxo de indivíduos entre fragmentos se estabelece quando a matriz é composta por árvores nativas com recursos requeridos para cada espécie (Oliveira *et al*, 2010). Em plantas, a conectividade entre subpopulações é limitada pelo hábito sésstil desses organismos. Espécies anemocóricas e barocóricas são prontamente afetadas pelo processo de fragmentação, mas na maioria dos casos, as plantas superam essa

limitação interagindo com vetores de dispersão (Young *et al*, 1996). Os efeitos genéticos do isolamento também são acentuados pela longevidade de cada espécie, tempo de geração e pela abundância antes da fragmentação (Young *et al*, 1996).

Apesar de a fragmentação exercer um papel decisivo na configuração do habitat, a biodiversidade sofre mais quando a fragmentação vem acompanhada da perda de habitat (Fahrig, 1997). Esses dois processos em conjunto promovem alterações microclimáticas e estruturais que afetam direta ou indiretamente a comunidade biótica (Harrison & Bruna, 1999). A perda de habitat foi um dos principais fatores responsáveis pela inclusão da Floresta Atlântica na lista de *hotspots* de biodiversidade (Myers, 2000).



**Figura 1** - Imagem de satélite mostrando as alterações na configuração da paisagem devido à fragmentação. Note o domínio da Mata Atlântica no sul da Bahia em amarelo e os remanescentes em verde. **Adaptado da Fundação SOS Mata Atlântica/INPE.**

### 2.1.1 Mata Atlântica no sul da Bahia

O domínio da Mata Atlântica ocupa 33% do território baiano. Dentre essa porcentagem apenas 8,97% compõem os remanescentes de floresta do estado (SOS Mata Atlântica/INPE, 2011). Uma de suas formações mais exuberantes é a Floresta Ombrófila Densa (Figura 2), definida pela lei federal 11.428 de 22/12/2006 como floresta com árvores de grande e médio porte, com lianas e epífitas ocorrendo em áreas com clima tropical quente e úmido. No sul da Bahia, ela forma tipologias conhecidas como florestas de terra baixa e de tabuleiro além de porções de montana e mussununga, distribuídas no sentido norte-sul (Thomas, 2003). As principais famílias encontradas nesse tipo de formação são Sapotaceae, Meliaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae, Arecaceae com predominância de Myrtaceae e Fabaceae (Thomas *et al*, 2009; Thomas *et al*, 1998). A reunião das tipologias supracitadas estabelece um importante centro de endemismo. Nelas encontram-se plantas do gênero *Brodriguesia*, *Arapatiella*, *Affonsea* e *Harleyodendron* pertencentes à família Fabaceae; *Atractantha*, *Anomochloa*, *Alvimia* e *Sucrea* da família Poaceae; *Attalea funifera* da família Arecaceae (Thomas *et al*, 1998), além da *Manilkara multifida*, *Manilkara maxima* e *Manilkara longifolia* pertencentes ao grupo das Sapotaceae.

Contudo, apesar de formar importante área de endemismo, a Mata Atlântica do sul da Bahia registrou a incidência de longos períodos de perturbações antrópicas sobre a biota. Por exemplo, árvores como brauna (*Melanoxylon brauna*), jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) e pau-brasil (*Caesalpineia echinata*) tiveram suas populações bastante reduzidas e hoje é raro encontrar exemplares destas arbóreas na região. Esse processo ganhou força durante o ciclo de devastação que se projetou do sudeste do país para o sul da Bahia na década de 70. Segundo Mesquita (1997), a projeção desse ciclo foi motivada pelo setor metalúrgico que tinha exaurido os recursos madeireiros de Minas Gerais e Espírito Santo. Os danos não foram maiores porque o sul da Bahia mantinha fazendas de cacau que precisavam das árvores de grande porte para sombreamento. Esse tipo de sistema agroflorestal conhecido como “cabruca” garantiu a persistência de várias árvores nativas assegurando recursos importantes para populações de espécies dependentes de seus frutos, néctar, ocos e látex (Oliveira *et al*, 2010). Entretanto, o panorama de resistência local logo foi alterado devido à crise econômica mundial, à vassoura-de-bruxa e à má administração das lavouras (Mesquita, 1997). Mesmo

com a crise da lavoura cacaueteira, ainda hoje são encontrados remanescentes com espécies arbóreas de grande valor comercial que não sofreram o processo extração madeireira (Thomas *et al*, 2009).

Além da cabruca, outros tipos de cultura são verificados nos domínios da Mata Atlântica como plantações de eucalipto, borracha, cravo, coco, banana e pupunha. A manutenção dos remanescentes da Mata Atlântica hoje está resguardada pela lei federal 11.428 de 22/12/2006 que proíbe o corte e a supressão das vegetações primária e secundária em estágio avançado, médio e inicial de regeneração. Com o intuito de mitigar os efeitos da fragmentação e perda de habitat no Domínio Atlântico, vários pesquisadores vêm desenvolvendo estudos populacionais no âmbito da genética e ecologia, levantamentos de espécies, e estudos das relações entre a flora e fauna originais com as cabrucas. Esses estudos servem de subsídio para políticas direcionadas à conservação da Mata Atlântica e de base científica para entidades envolvidas nessa perspectiva.



**Figura 2** - Floresta Ombrófila Densa de terra baixa localizada no Parque Estadual Serra do Conduru.



## 2.2 *Manilkara multifida*

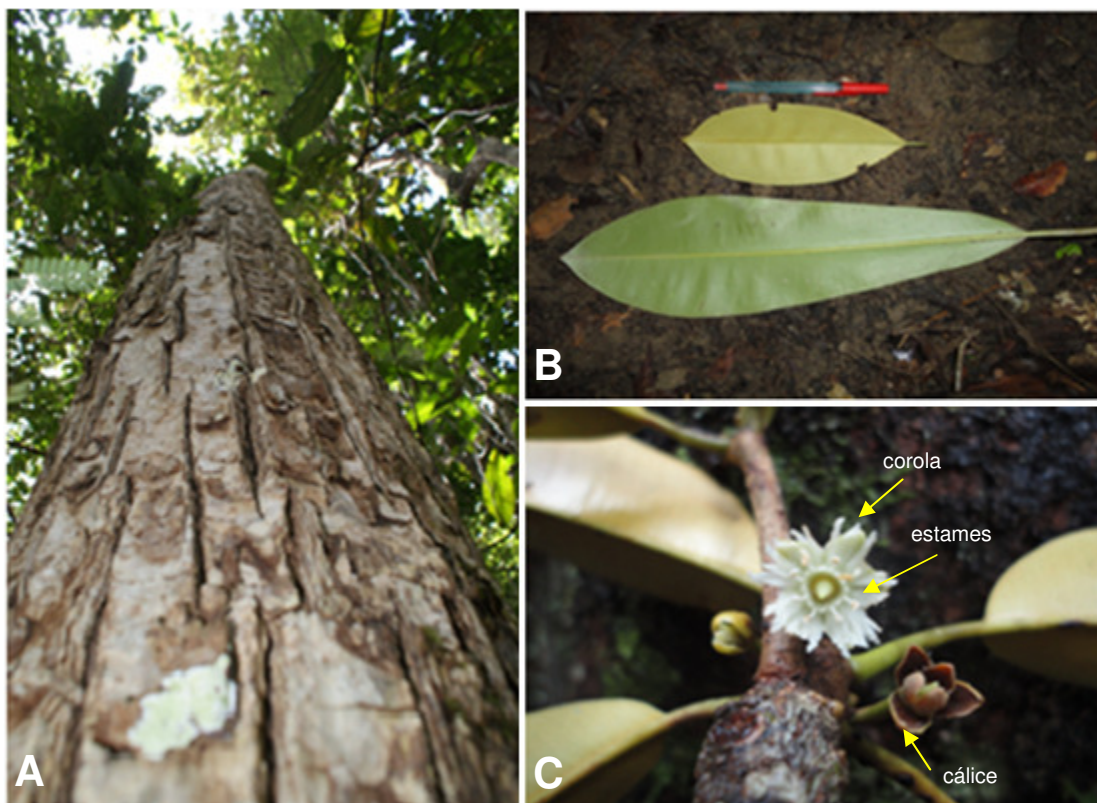
Historicamente o gênero *Manilkara* descrito por Adanson em 1763 deriva de algumas espécies dos gêneros *Mimusops* e *Achras* descritos por Linneaus em 1753, sendo *Manilkara kauki* a primeira espécie do gênero atribuída por Dubard em 1915 (Kukachka, 1981). Juntamente com outros gêneros como *Pouteria*, *Chrysophyllum*, *Ecclinusae Pradosia*, o gênero *Manilkara* está incluído na família Sapotaceae proposta por Jussieu em 1789. A família Sapotaceae pertence à ordem Ericales e forma um grupo-irmão com as famílias Ebenaceae, Maesaceae, Theophrastaceae, Primulaceae e Myrcinaceae (Stevens, 2008). As Sapotaceae possuem hábito arbóreo ou arbustivo e apresentam características vegetativas importantes como látex branco (raramente amarelo) muito frequente no tronco, ramos e frutos, além de filotaxia alterna com distribuição das folhas em espiral (Pennington, 1990). São comercialmente apreciadas pelo látex e compostos lipídicos utilizados na produção de goma de mascar, balata, óleos e azeites (Monteiro *et al*, 2007).

Em particular, a *Manilkara multifida* tem como características a presença de caule acinzentado com lenticelas proeminentes (Figura 3A), e segundo Pennington (1990) chegam a medir 14m de altura. Porém, não é difícil verificar árvores com mais ou menos 30m de altura no campo (observação pessoal). Com base em caracteres vegetativos, a identificação da *M. multifida in situ* é facilitada pela presença de folhas coriáceas largas e discoloras com face adaxial glabra e indumento diminuto apressado na face abaxial (Pennington, 1990). O conjunto de indumentos confere à folha uma coloração dourada destacando a copa de suas árvores dossel (Figura 3B). Dentre o gênero *Manilkara*, apenas a *M. multifida* é tetrâmera, isto é, possui verticilos florais múltiplos de quatro (Pennington, 1990). No campo o caractere reprodutivo mais evidente e peculiar para a identificação é o conjunto de oito estames (Figura 3C).

Essa espécie está restrita à Floresta Ombrófila Densa do sul da Bahia. Sua distribuição aparentemente não está sujeita às barreiras impostas pelos rios de Contas e Jequitinhonha que cortam a Floresta Atlântica do sul da Bahia no sentido leste-oeste. Diferente de *Harleyodendron* que está confinado à região localizada entre esses dois rios (Thomas, 2003), e de *M. maxima* que se encontra à porção norte do rio Jequitinhonha. A maior densidade de árvores de *M. multifida* é encontrada ao sul do Jequitinhonha principalmente na região de Porto Seguro, e tende a decrescer à medida que se aproxima da região norte. Na região de Una, por

exemplo, verifica-se maior número de árvores de *M. maxima*. Estas concentram-se em grande número no platô, enquanto os exemplares de *M. multifida* são mais frequentes nas regiões de baixada. Até o momento, não existem estudos referentes à história natural de *M. multifida* no que se refere à influência de polinizadores ou dispersores sobre a distribuição de sua prole no ambiente. Entretanto, alguns estudos em floresta ombrófila densa revelam a interação de outras espécies do gênero *Manilkara* com moscas e abelhas (Maués, 2007) e baseados em análises genéticas indicam uma dispersão em pequena escala (Azevedo, 2007). Por exemplo, não foram descritos ainda seus polinizadores e dispersores de sementes, nem quais organismos de dossel interagem com sua copa.

Popularmente, *M. multifida* é conhecida como maçaranduba e está entre as espécies que sofreram com a ação da indústria madeireira devido ao seu valor comercial. Em geral, as árvores do gênero *Manilkara* são anatomicamente uniformes e possuem madeira pesada e resistente (Kukachka, 1981). Por isso são consideradas madeiras úteis para a construção civil. Devido à perda de exemplares e sua distribuição restrita a fragmentos do Domínio Atlântico, *M. multifida* passou a ser classificada como espécie ameaçada de extinção pela IUCN (O'Brien, 1998). Entretanto, devido aos resultados do estudo contratado pelo convênio IBAMA/Fundação Biodiversitas, o governo brasileiro não reconhece o status internacional estabelecido para esta espécie, embora a Fundação Biodiversitas tenha utilizado os mesmos critérios de avaliação da IUCN. Vale ressaltar que uma breve consulta à página [http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/consulta\\_fim.asp](http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/consulta_fim.asp) da Fundação Biodiversitas, o consulente é direcionado à classificação estabelecida pela IUCN.



**Figura 3** - Diferentes partes da *M. multifida*. **(A)** Flor com oito estames e corola branca ao lado de um cálice avermelhado. **(B)** A folha menor corresponde a uma árvore de grande porte (note a coloração dourada da face abaxial devido aos tricomas). A maior representa um espécime com aproximadamente 70 cm. **(C)** Caule acinzentado mostrando as lenticelas proeminentes.

### 2.2.1 Descrição botânica da *M. multifida*.

O florescimento da *M. multifida* ocorre durante o mês de setembro, época em que as flores surgem apresentando corola branca com cálice avermelhado. As árvores dessa espécie apresentam flores pequenas com a corola medindo apenas de 04 a 05 mm de comprimento. As sépalas são geralmente elíptico-lanceoladas, agudas ou obtusas. Os estames seguindo a proporção dos verticilos protetores apresentam filetes com 02 a 03 mm de comprimento. Os estaminóides glabros com 01 mm de comprimento são oblongos com ápice truncado ou emarginado. O ovário cônico com 11 lóculos também é desprovido de pêlos e mede de 03 a 04 mm de comprimento após a antese. As inflorescências apresentam de 05 a 06 flores em fascículos com pedicelos que medem de 0,9 a 01 cm de comprimento (Figura 4A).

As ramificações jovens apresentam cor marrom-escuro, são glabras e têm uma camada de resina no ápice. Suas estípulas são geralmente lanceoladas com comprimento que varia de 1,5 a 02 mm, também são desprovidas de pelos. As folhas chegam a medir 9,1 a 14 x 5,5 a 6,7 cm com formato oblongo-elíptico a oblanceolado com ápice truncado. Em alguns casos, o ápice apresenta-se levemente emarginado e a base varia de obtusa a aguda. A face adaxial é glabra, a nervura principal encontra-se levemente proeminente, mas invaginada (Figura 4A). As nervuras secundárias variam de 20 a 22 pares formando uma nervura submarginal indistinta (Figura 4B). O pecíolo com 02 a 03 cm de comprimento forma um leve canal próximo ao ápice além de ser desprovido de tricomas. (Descrição baseada em Pennington 1990).



**Figura 4 - (A)** Folha de *M. multifida* mostrando a face adaxial glabra com nervura principal invaginada e nervuras secundárias submarginais indistintas. **(B)** Inflorescência do tipo fascículo mostrando o conjunto de 05 flores.

### 2.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Em 1908, G. H. Hardy e W. Weinberg postularam independentemente um modelo nulo que estabelece pressupostos para uma população panmítica, sem mutação, sem seleção de um genótipo específico, sem migração, com tamanho efetivo infinito (o que pressupõe freqüências alélicas constantes, isto é, ausência de deriva), na qual os alelos segregam independentemente (Herança Mendeliana). Esse modelo, conhecido como Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), é muito utilizado em estudos que envolvem marcadores genéticos, pois permite confrontar as freqüências genotípicas observadas com as esperadas para uma população ideal (Selkoe &Tooney, 2006). Em seu trabalho clássico intitulado “Mendelian Proportion

in a Mixed Population” publicado em 1908, Hardy põe em cheque a recorrente ideia de que os alelos dominantes tendem a aumentar sua frequência e os recessivos a desaparecer. De acordo com seu trabalho, a distribuição binomial  $p^2:2pq:q^2$  mostra a estabilidade das frequências alélicas ao longo das gerações, além de tornar evidente a relação entre frequência genotípica e frequência alélica. Nessa distribuição, Hardy prescreve as proporções genotípicas esperadas para uma população com cruzamento aleatório e que não sofra os efeitos de fatores evolutivos. Portanto, fica evidente que a frequência genotípica depende da frequência alélica.

Embora seja impossível obedecer aos pressupostos de Hardy-Weinberg, muitas populações com cruzamento aleatório podem ser encontradas em aderência ao EHW, quando as taxas de mutação e seleção são consideradas irrisórias (Freeland, 2005). Mas na maioria dos casos, são evidenciadas alterações da frequência alélica atribuídas à deriva genética aleatória de uma geração para a outra. Em outros casos, os desvios do EHW são devidos ao Efeito Wahlund que reduz o número de heterozigotos quando subpopulações são analisadas como uma única população (Hartl & Clark, 2010).

As análises com frequências genotípicas fornecem medidas de diversidade genética importantes para a compreensão de processos evolutivos nas populações. É com base nos heterozigotos que podemos comparar a frequência observada ( $H_O$ ) com a diversidade alélica ( $H_E$ ) que é esperada para uma população em EHW. Na ausência de Efeito Wahlund e de alelos nulos, desvios entre  $H_O$  e  $H_E$  indicam que uma determinada população não obedece aos pressupostos de Hardy-Weinberg. A partir desses descritores, podemos estimar também a diferença genética entre populações. Trata-se da análise de forças evolutivas que conduzem os alelos dentro de cada população para a fixação. A deriva genética constitui a força evolutiva mais influente dentro das populações. Uma vez que as populações são compostas por número finito de indivíduos, flutuações aleatórias da frequência alélica são inevitáveis (Vellend & Geber, 2005). O tamanho reduzido das populações também aumenta a probabilidade de fixação alélica devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados. O nível de endogamia dentro de uma população pode ser acessado utilizando o coeficiente de endocruzamento ( $f$ ), que é a probabilidade de um indivíduo diplóide possuir em um *locus* dois alelos idênticos por descendência (Allendorf & Luikart, 2007). Em contrapartida, os impactos do isolamento entre

populações são minimizados quando se estabelecem eventos de migração entre ambas. Nesse processo, as populações herdaram novos alelos em um ou mais locos tornando-se geneticamente homogêneas (Vellend & Geber, 2005). Para descrever a diferenciação genética entre populações podemos utilizar dois descritores importantes: o  $F_{ST}$  proposto por Wright e seu análogo  $\theta$  proposto por Weir & Cockerham. Ambos expressam a proporção de diversidade genética resultante das diferenças alélicas entre populações, com a diferença de que o índice de fixação  $\theta$  considera a variação no tamanho populacional (Holsinger & Weir, 2009).

## 2.4 MICROSSATÉLITES

O termo microssatélite foi proposto pela primeira vez por Litt & Luty em 1989 em estudos com genes do filamento de actina do músculo cardíaco. Os microssatélites são sequências compostas por unidades estruturais que se repetem em tandem. Geralmente são classificadas em mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos de acordo com a quantidade de nucleotídeos por unidade repetitiva. Embora essas unidades sejam consideradas apenas de 01 a 06 pb (*e.g.* Freeland, 2005), alguns autores pontuam que a amplitude pode variar até oito pares de nucleotídeos (Chambers & MacAvoy, 2000). Entre os dinucleotídeos, as repetições mais comuns em humanos e outros mamíferos são aquelas formadas por  $(AC)_n$  (Ellegren, 2004). Em plantas as repetições mais frequentes pertencem ao grupo dos dinucleotídeos  $(AT)_n$  (Morgante & Olivieri, 1993). Os microssatélites também conhecidos como SSRs (Simple Sequence Repeats), STRs (Short Tandem Repeats) ou VNTR (Variable Number Tandem Repeats) são mais comuns no genoma de mamíferos que em plantas (Lagercrantz *et al*, 1993). Além disso, são encontrados em pequenos eucariotos e em organismos procariotos (Field & Wills, 1996). Muitos organismos dentro desses grupos têm sido utilizados como modelos em análises de parentesco e de identidade, em estudos de estrutura e diversidade genética, além de estimativas de fluxo gênico e tamanho populacional.

### 2.4.1 Origem dos microssatélites

A origem dos microssatélites está relacionada à duplicação de sequências adjacentes por processos mutacionais que geram protomicrossatélites. Em

humanos, os protomicrossatélites surgem a partir de inserções e substituições através de mecanismos semelhantes à *slippage*, embora esta última não seja descartada para pequenas sequências (Zhu *et al*, 2000). Adicionalmente, os elementos transponíveis também possuem sítios com potencial para formação e distribuição de protomicrossatélites no genoma (Buschiazzo & Gemmell, 2006). O surgimento dos microssatélites ocorre por meio de duplicações subseqüentes durante a replicação. Esse mecanismo é conhecido como *slippage* e reflete em erros no pareamento de bases complementares durante o deslizamento da enzima DNA polimerase sobre a fita molde (Levinson & Gutman, 1987). A *slippage* é responsável pela geração de sequências polimórficas em um loco específico (Schlötterer & Tautz, 1992), que ocorre com mais frequência em regiões com maior número de unidades repetitivas (Brinkmann *et al*, 1998).

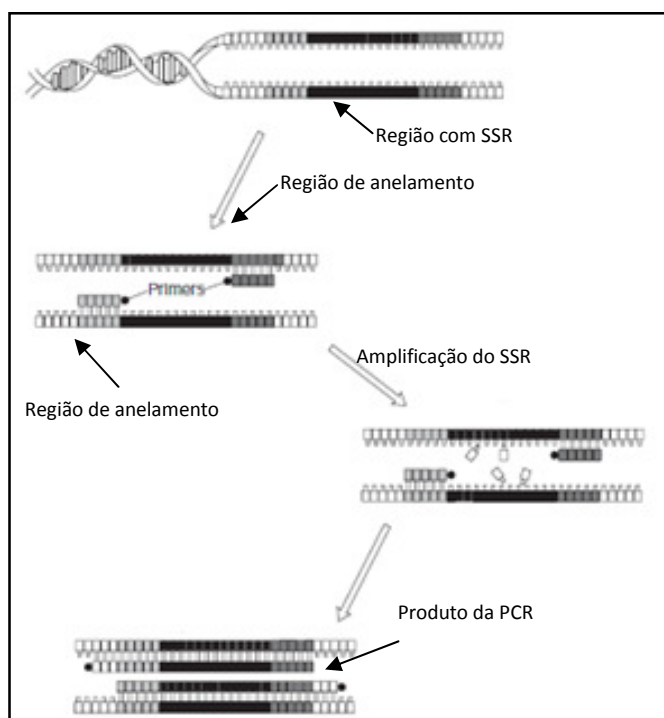
Esse evento torna os microssatélites altamente variáveis, isto é, um conjunto de locos pode apresentar alelos com sequências nucleotídicas de diferentes comprimentos. Já nos primeiros estudos, os microssatélites mostraram elevado número de alelos, por exemplo, Litt & Luty (1989) encontraram 17 alelos para uma sequência (TG)*n* em humanos.

#### 2.4.2 Primers

Além das sequências variáveis, os locos microssatélites possuem sequências conservadas conhecidas como regiões de anelamento de primers. Essas regiões permitem que *primers* sejam sintetizados *in vitro* e utilizados em PCR (Polimerase Chain Reaction) durante a amplificação dos microssatélites (Figura 5). Os *primers* desenvolvidos para uma espécie frequentemente podem ser transferidos entre espécies ou entre grupos taxonômicos mais inclusivos devido à estabilidade das regiões flangeadoras. Em geral, o maior sucesso na transferibilidade de marcadores polimórficos ocorre no nível de espécie. Em plantas, a transferência é mais comum no nível de espécie e com menor frequência ao nível de gênero, enquanto em animais estende-se a grupos taxonômicos mais inclusivos (Barbará *et al*, 2007). Embora a transferência seja uma alternativa mais viável economicamente, o nível de polimorfismo é reduzido quando os *primers* são utilizados em espécies diferentes (Primmer *et al*, 1996). A especificidade dos *primers* é uma vantagem, pois reduz a frequência de contaminação por amplificação inespecífica. Essa propriedade

é importante, por exemplo, para espécies de floresta úmida, uma vez que elas apresentam folhas com fungos em sua superfície. Mesmo com uma limpeza acurada, há a possibilidade de resquícios contaminantes permanecerem no tecido durante a extração de DNA.

Entretanto, as sequências complementares dos *primers* não estão isentas de mutações. Eventos de *indels* e substituições na terminação 3' dos sítios de anelamento promovem a falha na amplificação dos alelos (Pompanon, 2005). Os mesmos acabam não aparecendo na genotipagem e por isso são chamados de alelos nulos. Outras causas também são atribuídas à presença de alelos nulos: i) amplificação preferencial de alelos com sequências curtas devido à competição durante a PCR e ii) DNA com concentração e qualidade diferentes entre espécimes, resultando em amplificações diferenciadas para um mesmo locus (Dakin & Avise, 2004).



**Figura 5** - Ilustração da região com microsatélites entre as regiões flanqueadoras. Amplificação dos microsatélites e o produto gerado pela PCR. Adaptado de Allendorf & Luikart, 2007.

#### 2.4.3 Genotipagem

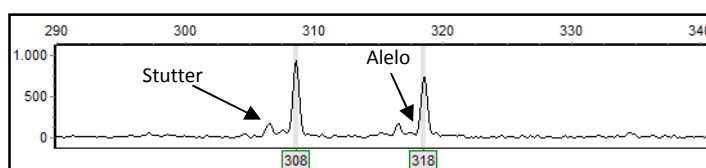
Os microsatélites são marcadores codominantes, pois permitem a distinção entre genótipos homozigotos de heterozigotos. Por tratar-se de marcadores neutros,



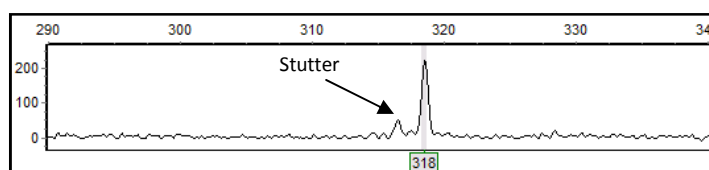
o termo codominante aqui não se refere ao conceito clássico de interação gênica, mas à visualização dos produtos da PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os genótipos são caracterizados como produtos da PCR que podem ser visualizados em géis de eletroforese ou em eletroferogramas. Em géis de eletroforese os produtos da amplificação são corados e visualizados diretamente como bandas em géis de agarose ou poliacrilamida. Nos eletroferogramas, os produtos aparecem como picos e são visualizados em softwares como GeneMapper ou GeneMarker. Os picos são gerados porque analisadores genéticos são capazes de detectar a radiação emitida por *primers* marcados com fluorescência. Os homozigotos costumam apresentar apenas um pico que é definido como alelo (Figura 06), enquanto os heterozigotos apresentam dois picos (alelos) (Figura 07). A genotipagem em analisadores genéticos é preferível por apresentar maior acurácia na discriminação dos alelos do que géis de eletroforese.

Frequentemente outros produtos da PCR são visualizados além dos alelos. Esses produtos conhecidos como “*stutters*” possuem segmentos nucleotídicos menores que os alelos e estão associados à *slippage* durante a PCR (Ellegren, 2004). No eletroferograma são visualizados como pequenos picos (Figuras 6 e 7). Em alguns casos, os *stutters* formam uma sequência de picos que dificultam a genotipagem (Pompanon et al, 2005).

Os alelos nulos também conduzem a erros de genotipagem. A falha na amplificação de um alelo em genótipos heterozigotos faz com que os mesmos sejam caracterizados como homozigotos.



**Figura 6** - Eletroferograma mostrando um genótipo heterozigoto.



**Figura 7** - Eletroferograma mostrando um genótipo homozigoto.

#### 2.4.4 Aplicação dos microssatélites

Durante a década de 1990 houve um crescimento do número de estudos utilizando os microssatélites em comparação com outros marcadores (Schlötterer, 2004). Os microssatélites têm como característica fundamental para estudos populacionais a natureza codominante que permite análises baseadas em frequências alélicas (Escudero *et al*, 2003). Outra característica é a sua variabilidade que tem tornado a abordagem direta para a quantificação do fluxo gênico mais viável (Ouborg *et al*, 1999), embora em alguns casos a variabilidade aumente a chance de homoplasia (Jarne & Lagoda, 1996). Salvo suas limitações em abordagens filogenéticas, os microssatélites podem ser empregados de forma indireta em estudos de dispersão em plantas (Ouborg *et al*, 1999), em análises de parentesco (Queller *et al*, 1993) e estrutura genética (Chase *et al*, 1996). Também podem ser utilizados em estudos de diversidade genética (Tamaki *et al*, 2008) e identificação individual como método não invasivo (Mondol *et al*, 2009).

### **3 CAPÍTULO 01**

**AoB Plants – ACCEPTED ARTICLE**

**OPEN ACCESS – TECHNICAL ARTICLE**

#### **MICROSATELLITE MARKERS FOR AN ENDEMIC ATLANTIC FOREST TREE, *Manilkara multifida* Penn. (SAPOTACEAE)**

Ramiris C. S. Moraes<sup>1</sup>; Caio V. Vivas<sup>1</sup>; Fernanda A. Oliveira<sup>1</sup>; Ivandilson P. P. Menezes<sup>1</sup>; Cassio van den Berg<sup>2</sup>; Fernanda A. Gaiotto<sup>1\*</sup>.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Av. Transnordestina s/n 44036-900 Feira de Santana, Bahia, Brazil;

\*Corresponding author

Corresponding author's e-mail address: gaiotto@uesc.br

## **ABSTRACT**

### **Background and aims**

*Manilkara multifida* is a tropical tree that is endemic to the Atlantic forests of southern Bahia, Brazil. Currently, populations of this species are restricted to fragmented landscapes that are susceptible to anthropogenic disturbances. Considering this issue, and that there is no genetic information available for this endangered species, we developed microsatellite markers for *M. multifida* to provide resources for future conservation genetics studies.

### **Methodology**

Using an enriched genomic library, we isolated eight polymorphic microsatellite loci and optimized the amplification conditions for *M. multifida*. For each locus, we estimated the number of alleles,  $H_E$  and  $H_O$ , paternity exclusion  $Q$ , individual identity  $I$  and fixation index  $F$  and examined the presence of null alleles.

### **Principal results**

The mean number of alleles was 11.9, and the heterozygosity was high at all loci (average  $H_E = 0.809$  and  $H_O = 0.777$ ). The combined values for both paternity exclusion and individual identity were  $Q = 0.9959$  and  $I = 5.45 \times 10^{-11}$ , respectively. No evidence of null alleles was detected.

### **Conclusions**

The results of our analysis indicated that all eight microsatellites are promising for assessing questions involving inbreeding, gene flow, coancestry, and mating patterns in *M. multifida*.

## INTRODUCTION

The Atlantic Forest is the second largest tropical forest in South America. Its original area measured approximately 1 500 000 km<sup>2</sup> ranging along the Brazilian Atlantic coast, with additional patches in Argentina and Paraguay (Ribeiro *et al.* 2009). Currently, only 11.4% to 16% of its original cover remains, and it is distributed in a fragmented landscape (Ribeiro *et al.* 2009) as a consequence of land use and occupation. Most Brazilians live in areas that were originally covered by the Atlantic Forest, which increases the pressure on native forest species. Southern Bahia, Brazil, is a particularly diverse region of the Atlantic Forest, especially in terms of tree species, and for many years, inadequate forest management and agriculture intensification reduced the amount of forest cover as well as the abundance of tree species. During the 1970s, the timber industry alone caused major environmental damage in this region (Mesquita 1997), and several species, including *Manilkara multifida* Penn., suffered significant reduction in that period due to the high commercial value of their timber.

*M. multifida* is a rare tree species endemic to the Atlantic Forest of southern Bahia, and it is included on the IUCN Red List as an endangered species (O'Brien 1998). Members of the genus *Manilkara* are known to provide important food resources for primates (Oliveira *et al.* 2009), but there are no data about the functional and evolutionary role of *M. multifida* in its habitat. Trees of this species are lactescent and have flowers with red sepals and white petals (Pennington 1990). They can also be identified by their wide and discoloured leaves, which are covered by an adpressed indumentum on the abaxial face, and by their numbers of petals, stamens and staminoids (8-9 altogether) (Pennington 1990). In the present study, we report the development and characterization of the first microsatellite markers for *M. multifida*. This resource will help researchers obtain experimental data for the elaboration of genetic inferences that will contribute to conservation programs for this species.

## MATERIALS AND METHODS

### Genomic library and primer design

A genomic library was constructed from template DNA (250 ng/μL) extracted via the CTAB method (Doyle and Doyle 1990). Isolated DNA was digested with the restriction enzyme *RsaI* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Fragments of between 200 and 800 bp were captured and linked to the adapters Rsa21 and Rsa25 (Edwards *et al.* 1996) using T4 DNA ligase. The DNA fragments containing microsatellites were captured by hybridization with biotinylated probes (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> and recovered using magnetic streptavidin beads (Promega). These fragments were then amplified by PCR according to the following conditions: initial denaturation at 95°C for 1 min; 25 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 60°C for 40 s and extension at 72°C for 2 min; and final extension at 72°C for 5 min. Amplicons were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA), which was then transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A set of 96 positive clones were amplified using M13 primers and Big Dye<sup>®</sup> Terminator reagents (version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and sequenced using a DYEnamic<sup>™</sup> kit. Among these, 22 clones were discarded due to low quality sequencing data (chromatograms). We analyzed the remaining 74 sequences using SSRLocator software (Maia *et al.* 2008) and detected 67 containing microsatellites. A total of 14 pairs of primers were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky2000).

### **Characterization of microsatellite loci**

We tested the optimized primers in two steps: PCR amplification and electrophoretic analysis. The PCR reactions contained genomic DNA (7.5 ng), ultrapure water, 1× buffer (Fermentas), BSA (2.5 ng/μL), dNTPs (2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), tailed M13 forward and reverse primers (10 μM) labeled with DS-33 fluorescent dyes (NED<sup>™</sup>, 6-FAM<sup>™</sup>, PET<sup>®</sup> or VIC<sup>®</sup>, dyes Applied Biosystems), and *Taq* DNA Polymerase (1 U). Reactions were carried out in a BioEr LifePro thermal cycler under the following conditions: 94°C for 3:30 min, 94°C for 1 min, T<sub>a</sub>°C for 45 s, 72°C for 1 min and 72°C for 15 min. Eight primer pairs successfully amplified DNA fragments from samples from 32 *M. multifida* individuals from the RPPN Estação Veracel (Porto Seguro, Bahia, Brazil) and Reserva Biológica de Una (Una, Bahia, Brazil) conservation units. The sizes of the labeled amplified fragments were determined by capillary

electrophoresis (ABI 3130XL Genetic Analyzer) with the internal size standard GS500 LIZ (Applied Biosystems) using GeneMapper software (Applied Biosystems).

### **Analyses performed**

We assessed paternity exclusion  $Q$ , diversity indices  $H_E$  and  $H_O$ , and allelic identity ( $I$ ) using Cervus 3.0.3. (Marshall 1998) We also computed the fixation index ( $F$ ) in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002) and examined for null alleles using Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004).

## **RESULTS**

The average of 11.9 alleles per locus indicated high levels of polymorphism. The expected heterozygosity ranged from 0.622 to 0.911, and the observed heterozygosity ranged from 0.563 to 0.969. The MM03 and MM86 loci showed negative values of  $F$  (indicating excess heterozygotes). The combined exclusion probability of  $Q$  indicates that this set of microsatellites will be a powerful tool for future paternity studies. The  $I$  combined estimation confirms the potential use of this set of markers from *M. multifida* for identity analyses. Null alleles were not observed at any locus, according to the Brookfield 1 method (Brookfield 1996). In many cases, the presence of null alleles, which usually occur due to a mutation in the primer annealing region, inflates the frequency of homozygotes. The Micro-Checker software found no genotype scoring errors due to stutter bands or allelic dropout.

## **CONCLUSIONS and FUTURE DIRECTIONS**

The eight polymorphic microsatellite markers developed in this study display important discrimination capacities. These loci therefore have excellent potential to be used in genetic studies of *M. multifida* aiming toward the conservation of this species.

## **ACCESSION NUMBERS**

The sequences were deposited in the GenBank database with the following accession numbers: JX183540 [MM03]; JX183541 [MM07]; JX183542 [MM56]; JX183543 [MM62]; JX183544 [MM78]; JX183545 [MM83]; JX183546 [MM86]; JX183547 [MM90].

## **SOURCES OF FUNDING**

This work was funded by the Fundo de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB, PNX0014/2009 and APR0192/2008). M. Sc. R. C. S. M. was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and F. A. G. was supported by a Research Fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **CONTRIBUTIONS BY AUTHORS**

RCSM collected samples in the field and participated in the primer design, characterization of the microsatellite loci and manuscript editing.

CVV participated in the fieldwork and data analysis.

FAO participated in the data analysis.

IPPM developed the genomic library.

CvdB participated in the microsatellite marker validation and manuscript editing.

FAG participated in the microsatellite marker validation and manuscript editing.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

There are no conflicts of interest to disclose in this section.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**



We thank Maria Cristina López-Roberts, Roberto Tarazi and Siu Mui Tsai for support in the laboratory and Eduardo Mariano-Neto, Jiomário dos Santos Souza and Veracel Celulose S.A. for support in the field.

## REFERENCES

- Brookfield JFY. 1996.** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*5: 453-455
- Doyle JJ, Doyle JS. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A. 1996.** Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* 20: 758-760.
- Goudet J. 2002.** FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3.2. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Maia LC, Palmieri DA, Souza VQ, Kopp MM, Carvalho IF, Oliveira AC. 2008.** SSR Locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *International Journal of Plant Genomics* 2008: 1-9.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998.** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*7: 639-655.
- Mesquita CAB. 1997.** Exploração madeireira no sul da Bahia: situação atual e perspectivas. *Revista dos Mestrados em Direito Econômico da Universidade Federal da Bahia*. Edição Especial de Direito Ambiental: 121-135.
- Oliveira LC, Hankerson SJ, Dietz JM, Raboy BE. 2009.** Key tree species for the golden-header Lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. *Animal Conservation* 13: 60-70.
- O'brien JP. 1998.** *Manilkara multifida*. In IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.
- Pennington TD. 1990.** Flora Neotropica, monograph n° 52 (Sapotaceae). Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Gardens.

**Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009.**The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.

**Rozen S, Skaletsky H.2000.**Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365-386.

**Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004.** Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

## Tables

Table 1. Description of the eight nuclear SSR markers developed for *Manilkara multifidain* the present study, with forward (F) and reverse (R) sequences, repeat motif, annealing temperature, size range.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	$T_a$ (°C)	Size range (bp)
MM03	F: CTGCATTGTAGCCGAAGAGA R: CAGGTGCAGCCAGCTCT	(AC) $7n31$ (AG) $9$	52	202-242
MM07	F: CAGATTCGAGATAAGTGGAAGTCA R: AGGCACATCCACATATGCAC	(TG) $10n64$ (AT) $4$	56	172-202
MM56	F: TGAGTGCCGACTCTCACT R: ATCATCTCCATGCGACACAC	(CA) $10$	54	294-324
MM62	F: CCAAACAGAGTGCAACTAAA R: CCCATCCCTATTAACAGTTG	(CT) $15$ (CA) $7$	56	270-298
MM78	F: GGGTGAGCACATGGTCAAA R: CACTGTTCAACTTCAATGGTATC	(ATAA) $6$	58	158-224
MM83	F: GCCCGACCCTCCTTATTA R: CCAAGATGTATGTTGGGATGAA	(TG) $6n49$ (GT) $11$	58	330-362
MM86	F: AAGTAGTTGGCAATTCAACAGG R: ATATTGCCATTAACGCATCG	(GT) $7n4$ (AT) $3$	52	194-218
MM90	F: TCAAGGTGCTTGATATCTGA R: CAGCCGTATTAATGGAGTGT	(TC) $4n16$ (AC) $9$	52	262-294

Table 2. Population genetic parameters calculated for eight microsatellite loci developed for *Manilkara multifida*. Number of alleles ( $N_a$ ), expected heterozygosity (HE), observed heterozygosity (HO), paternity exclusion index (Q), identity analysis (I), and fixation index (F).

Locus	$N_a$	$H_E$	$H_o$	$Q$	$I$	$F$
MM03	13	0.828	0.969	0.4956	0.0480	-0.173
MM07	11	0.855	0.750	0.5266	0.0420	0.125
MM56	07	0.700	0.563	0.2806	0.1472	0.199
MM62	15	0.911	0.844	0.6563	0.0193	0.075
MM78	17	0.888	0.813	0.6076	0.0266	0.087
MM83	11	0.764	0.625	0.3832	0.0849	0.185
MM86	08	0.622	0.813	0.2176	0.1874	-0.313
MM90	13	0.903	0.844	0.6338	0.0224	0.067
Mean	11.875	0.809	0.777	0.9959*	$5.45 \times 10^{-11}$ **	0.040

\*Combined exclusion probability

\*\* Combined estimation

## 4 CAPÍTULO 02

### ANÁLISES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ENTRE DIFERENTES GERAÇÕES DE *Manilkara multifida* Penn.

Ramiris C. S. Moraes<sup>2</sup>; Eduardo Mariano-Neto<sup>3</sup>; Caio V. Vivas<sup>2</sup>; Roberto Tarazi<sup>2</sup>; Fernanda A. Gaiotto<sup>2,4</sup>.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna km 16 s/n, Salobrinho 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil;  
<sup>3</sup>Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Geremoabo, 147 - Campus de Ondina;

#### RESUMO

Estudos de genética da conservação têm sido realizados em florestas tropicais com o objetivo de gerar conhecimentos que auxiliarão gestores na redução dos impactos relacionados a perturbações humanas. A compreensão de processos evolutivos nos remanescentes florestais inseridos em paisagens fragmentadas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo. Para tanto, foram realizados estudos genéticos em duas populações de *Manilkara multifida* – espécie endêmica da Mata Atlântica do sul da Bahia. Foi comparada a variabilidade genética entre árvores adultas e juvenis dentro de fragmentos florestais, e a estrutura genética entre populações distantes 145 km, utilizando um conjunto de oito locos microsatélites desenvolvidos para *M. multifida*. Os dados foram analisados estimando os índices  $H_E$ ,  $H_O$ ,  $f$  e  $\theta$  de Weir & Cockerhan. Como resultado, foi observado que a diversidade genética encontrada para as árvores adultas é maior que a diversidade dos juvenis. Quanto à diferenciação genética, observou-se que os juvenis apresentam maior estrutura que os adultos. Os juvenis apresentaram  $\theta = 0.109$  enquanto os adultos apresentaram  $\theta = 0.017$ . Desta forma, podemos concluir que eventos como deriva genética e endogamia são provavelmente responsáveis pela redução da variabilidade genética dentro dos fragmentos, e que as perturbações humanas provavelmente influenciaram no aumento da diferenciação entre espécimes recentemente estabelecidos.

Palavras-chave: Floresta Atlântica; arbórea; sapotaceae; microsatellite; fragmentação de habitat.

## INTRODUÇÃO

HISTORICAMENTE, as árvores tropicais têm sofrido com perturbações antrópicas. Os impactos sobre populações arbóreas variaram desde um aparente manejo até o desmatamento de grandes áreas de floresta. Na Mata Atlântica, essa influência não foge à regra. Empreendimentos habitacionais, pecuária, agricultura e o uso de madeira para siderurgia, movelaria e construção civil levaram ao processo de fragmentação e perda de habitat. Em florestas tropicais, a aquisição de conhecimento sobre os efeitos desses dois processos tem direcionado as decisões sobre conservação da biota. Muitos estudos concentram-se em responder a perguntas científicas sobre paisagens, habitats, comunidades e populações, a fim de contribuir para a conservação dos sistemas originais. Assim, é possível tirar algumas conclusões importantes. Por exemplo, a conectividade favorece a persistência de pequenos mamíferos em manchas reduzidas (Pardini *et al*, 2005), o tipo de matriz pode mitigar os impactos do isolamento em grupos de primatas (Oliveira *et al*, 2010), e pequenos remanescentes na Mata Atlântica compreendem um grande número de espécies com alta densidade (Martini *et al*, 2007), incluindo aquelas particularmente sensíveis à redução e a fragmentação de habitat por serem longevas, tolerantes a sombra, emergentes ou dependentes de vertebrados para dispersão de sementes e polinização (Lopes *et al*, 2009; Pardini *et al*, 2009).

Com o propósito de reforçar a compreensão sobre a dinâmica florestal, muitos pesquisadores mantêm uma perspectiva integrativa entre a genética e a abordagem ecológica. Alguns estudos têm fornecido informações sobre fluxo gênico de longa distância entre fragmentos (*e.g.* Schierenbeck *et al*, 1997; Gaiotto *et al*, 2003); informações sobre a relação entre os padrões de diversidade genética em áreas fragmentadas e fluxo gênico histórico (*e.g.* Fuchs & Hamrick, 2010); além de comparar os efeitos da extração de madeira sobre a diversidade genética nas árvores de grande porte e na sua prole (*e.g.* André *et al*, 2008). Os estudos genéticos têm um importante papel para conservação de florestas. Frequentemente, essa abordagem utiliza medidas de heterozigosidade com o objetivo de estimar a

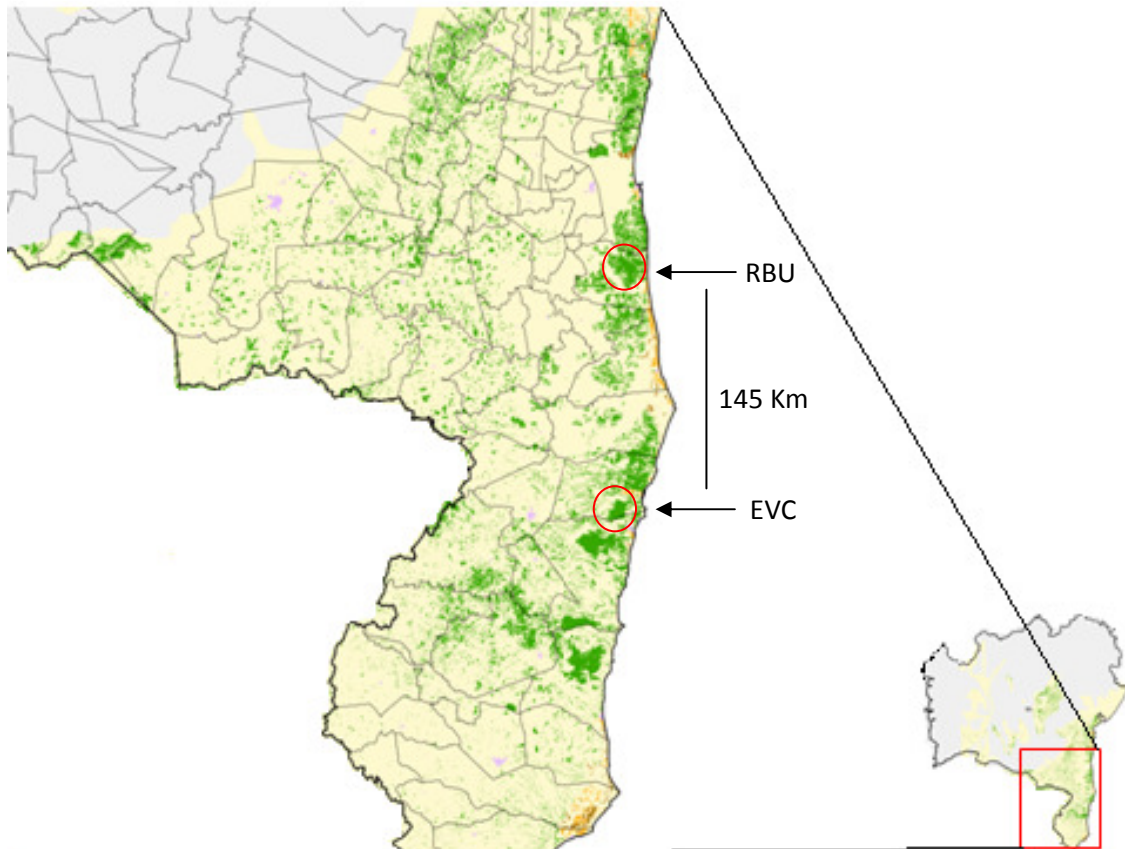
estrutura e diversidade em diferentes escalas de espaço e tempo. Pesquisadores lançam mão de diferentes ferramentas moleculares para essa finalidade: marcadores neutros que não estão sujeitos a pressões seletivas (e.g. microssatélites e SNP); ou traços adaptativos em adição aos genes para os quais as forças seletivas superam outros fatores evolutivos (e.g. Holderegger *et al*, 2006).

Como citado anteriormente, diversos impactos na Mata Atlântica levaram ao decréscimo de populações de diversas espécies arbóreas (e.g. *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Caesalpinia echinata*). Entre essas espécies, encontra-se *M. multifida* que consiste em uma árvore de dossel endêmica da Floresta Atlântica do sul da Bahia cobiçada pelo seu elevado valor comercial. *M. multifida* encontra-se na lista de espécies em perigo de extinção da IUCN (O'Brein, 1998). Atualmente, o seu manejo está restrito pela legislação brasileira que impede o corte de espécies da Mata Atlântica com variabilidade genética exclusiva de um determinado local. Entretanto, algumas concessões são dadas a empresas com atividades de utilidade pública, porém requerendo ações compensatórias como reflorestamento de outras áreas. Diante do atual cenário, para o presente estudo, foi estabelecida uma análise comparativa entre um conjunto de árvores adultas com CAP igual ou maior a 70 cm e um conjunto de jovens com CAP igual ou menor que 10 cm de *M. multifida* usando microssatélites para estimar parâmetros genéticos populacionais.

Portanto, foram abordados dois questionamentos: i) será que a diversidade genética encontrada atualmente nos jovens é menor que a diversidade genética dos adultos de um mesmo fragmento? ii) Existe maior divergência genética entre árvores adultas ou entre jovens de diferentes fragmentos? Também foram estabelecidas duas hipóteses: i) a diversidade genética encontrada nos jovens é menor quando comparada à diversidade encontrada nos adultos de um mesmo fragmento, e ii) existe maior estrutura genética entre jovens do que entre árvores adultas de fragmentos diferentes.

Os objetivos do atual trabalho consistiram em i) estimar a estrutura e diversidade genética nas populações de *Manilkara multifida* e ii) comparar os padrões genéticos em amostras de jovens e adultos.

Desta forma, acredita-se que os resultados destas análises fornecerão subsídios para o manejo adequado de fragmentos de floresta ombrófila no sul da Bahia.



**Figura 1.** Imagem de satélite mostrando os fragmentos da Reserva Biológica de Una e da Estação Veracel. **Adaptado da Fundação SOS Mata Atlântica/INPE.**

## MÉTODOS

**ESPÉCIE ESTUDADA** – As árvores do gênero *Manilkara* são anatomicamente semelhantes apresentando madeira dura e pesada (ver Kukachka, 1981). Em particular, *M. multifida* apresenta árvores de grande porte que chegam a medir aproximadamente 30 m de altura. Suas flores são dióicas com 5-10 em um fascículo com período de floração em setembro (Pennington, 1990). Sua imediata identificação no campo é facilitada por caracteres gerais das Sapotaceae – látex branco e geralmente filotaxia alterna. Em particular, *M. multifida* é identificada pela presença de 8-9 lóbulos da corola e estames, além de tricomas na face abaxial das folhas (Pennington, 1990). Este último caráter vegetativo é importante porque em muitos casos não é possível acessar as flores no campo.

**FRAGMENTOS FLORESTAIS ESTUDADOS E AMOSTRAGEM** – As análises foram realizadas na Reserva Biológica de Una (RBU) criada no ano de 1980 e na Reserva Particular do Patrimônio Natural Estação Veracel (EVC) criada em 1998 em Porto Seguro (Figura 1). Ambos consistem em fragmentos de floresta úmida com



estrutura clássica de Floresta Ombrófila localizados no sul da Bahia, Brasil (Thomas *et al*, 2003). Segundo os Planos de Manejo da RBU e da EVC os dois fragmentos apresentam uma superfície de 11.400 ha e 6.069 ha, respectivamente.

Os dois fragmentos estão cerca de 145 km de distância um do outro e apresentam históricos de exploração bem parecidos com intenso processo de extração de madeira em ambos os locais. A princípio, poucas áreas apresentam árvores de *M. multifida*. Além de RBU e EVC também foram visitadas outras quatro reservas florestais no sul da Bahia localizadas em Igrapiúna, Coaraci, Jussari e Itacaré, mas nenhuma apresentou árvores de *M. multifida*, exceto em Igrapiúna onde foram encontrados cinco exemplares.

A amostragem dos exemplares de *M. multifida* foi realizada obedecendo aos seguintes critérios: árvores adultas com CAP igual ou acima de 70 cm e jovens com CAP igual ou abaixo de 10 cm. Foram coletadas aleatoriamente folhas de 45 árvores adultas e 33 jovens em Una, e de 50 árvores adultas e 50 jovens em Porto Seguro. A distância mínima entre os espécimes jovens e adultos foi de 10 m.

**ANÁLISES GENÉTICAS** – Foi extraído DNA a partir de tecidos foliares seguindo o protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) e usados oito locos microssatélites para a genotipagem. A amplificação por PCR foi efetuada no termociclador LifePro da BioEr com uma mistura de 7,5ng de DNA genômico; água ultrapura; tampão 10x (Fermentas); BSA 3,25 ng; dNTPs 3,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM); primers *forward* e *reverse* com cauda M13 (3,9 μM) marcado com NED<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, PET<sup>®</sup> ou VIC<sup>®</sup>; e 0,4 μl de Taq polimerase (1U). O termociclador seguiu as condições: 94 ° durante 3:30 min; 94 ° durante 1 min; Ta ° C durante 45 seg; 72 ° C durante 1 min; e 72 ° C durante 1 min.

O produto da PCR foi verificado no analisador genético ABI3130XL (Applied Biosystems) com marcador GS500LIZ. O tamanho dos alelos foi definido pelo GeneMarker<sup>®</sup>.

**PARÂMETROS GENÉTICOS** - Para cada geração, estimou-se a riqueza alélica que consiste em uma medida sensível ao tamanho da amostra. Para estimar a quantidade de variabilidade genética em adultos e juvenis também foram utilizados os índices de diversidade genética ( $H_E$ ) e heterozigosidade observada ( $H_O$ ). Esses índices comparam a heterozigosidade esperada para uma população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg com a quantidade de heterozigosidade observada. Portanto, um

resultado com  $H_O$  menor que  $H_E$  indica a perda de diversidade genética entre gerações. Os valores médios da riqueza alélica,  $H_E$ ,  $H_O$ , e  $f$  foram estimados considerando o intervalo de confiança de 95% (IC<sub>95%</sub>) para todos os locos. A estrutura genética de adultos e juvenis foi estimada nos dois fragmentos. Em seguida, foram comparados os resultados que estão associados com o estabelecimento de sementes antes e após a fragmentação do habitat. A diferenciação genética entre as gerações foi calculada para ambas populações, utilizando estimador teta ( $\theta$ ). Esse índice considera a variação na frequência alélica e, portanto, reduz erros de amostragem (Holsinger & Weir, 2009). Os resultados de todos os parâmetros foram gerados pelo software FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2002). Também foi avaliada a importância dos índices de fixação  $f$  e  $\theta$  realizando 1.000 permutações para todos os locos e correção sequencial de Bonferroni para comparações múltiplas ( $\alpha = 0,05$ ) usando FSTAT.

## RESULTADOS

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA** - Como resultado da avaliação da distribuição da diversidade genética e endogamia dentro de populações, notou-se que os adultos da EVC e RBU mostraram valores semelhantes para riqueza alélica (9,6 e 8,8 respectivamente), diversidade gênica (0,815 e 0,818, respectivamente) e heterozigidade observada (0,720 e 0,736, respectivamente), utilizando comparação estatística por intervalo de confiança de 95% nos dois fragmentos. O coeficiente de endogamia ( $f$ ) também foi semelhante e significativo para ambas populações (p-valor < 0,0031) com médias moderadas para EVC = 0,103 e RBU = 0,097. A mesma comparação estatística (IC 95%) foi realizada para juvenis dos fragmentos estudados. Os juvenis da EVC e RBU também apresentaram valores semelhantes para a riqueza alélica (EVC = 8,1 e RBU = 7,1), , diversidade gênica (EVC = 0,731 e RBU = 0,729), e heterozigidade observada (EVC = 0,463 e RBU = 0,560). O coeficiente de endogamia foi maior que nos adultos apresentando valores elevados para EVC ( $f = 0,366$ ) e RBU ( $f = 0,231$ ). Vale ressaltar que os valores de riqueza alélica, diversidade gênica e heterozigidade observada tiveram médias maiores nos adultos do que em jovens, exceto o coeficiente de endogamia ( $f$ ) que foi maior nos jovens (Tabela 1). Levando em conta os fragmentos amostrados, a estrutura genética entre as populações apresentou valores diferentes

entre as gerações. Comparando os adultos nas duas áreas, notamos uma diferenciação reduzida entre EVC e RBU ( $\theta = 0,017$ ), apesar da baixa significância estatística (p-valor = 0,03). Por outro lado, os jovens não seguiram essa tendência e apresentaram alta diferenciação entre as duas populações ( $\theta = 0,109$ ), com alta significância (p-valor < 0,001).

**Tabela 1.** Índices genéticos calculados para árvores adultas e juvenis de *M. multifida*. Número de alelos ( $N_a$ ), Riqueza alélica ( $A_r$ ), diversidade gênica ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), coeficiente de endocruzamento ( $f$ ) e índice de diferenciação ( $\theta$ ).

	Local	Amostragem	$N_a$	$A_r^a$	$H_E^b$	$H_o^c$	$f$	$\theta$
Adultos	EVC	50	12,9	9,6	0,815	0,720	0,103**	0,017*
	RBU	46	10,9	8,8	0,818	0,736	0,097**	
Juvenis	EVC	50	9,9	8,1	0,731	0,463	0,366**	0,109***
	RBU	33	8,1	7,1	0,729	0,560	0,231**	

<sup>abc</sup>CI95%

\*P-valor = 0.03; \*\*P-valor < 0.0031; \*\*\*P-valor < 0.001.

## DISCUSSÃO

Até o momento, nenhum estudo tinha abordado questões relativas à genética populacional de *M. multifida*. Com as análises voltadas para populações dessa espécie, pode-se observar baixa diferenciação entre populações de árvores adultas distantes a 145 km, enquanto os juvenis apresentam alta diferenciação. Nota-se também uma diminuição da variabilidade genética entre gerações em diferentes fragmentos florestais. As análises de riqueza alélica e diversidade genética revelaram altas taxas de variabilidade genética em adultos tanto na RBU quanto na EVC, certamente devido à troca de alelos facilitada pela conformação da Mata Atlântica no passado quando era uma área florestal contínua com diferentes tipologias. Por outro lado, o coeficiente de endocruzamento verificado no conjunto de árvores amostradas fornece indícios de que, mesmo no passado, provavelmente havia fluxo gênico entre espécimes aparentados de *M. multifida*. Tendo em vista a longevidade destas árvores, a geração parental dos adultos atuais mantinha um conjunto de genes com potencial para promover os atuais níveis de

heterozigossidade. Provavelmente estas árvores precederam ao intenso processo de fragmentação e perda de habitat nos dois fragmentos de Mata Atlântica.

Para os jovens, os resultados de diversidade genética foram inversos aos dos adultos. Com exceção do coeficiente de endocruzamento ( $f$ ), foi observada uma redução de todos os parâmetros genéticos avaliados nos jovens em relação aos adultos nos dois fragmentos, provavelmente devido à amostragem de adultos provenientes de gerações diferentes no passado. Por sua vez, os jovens que se estabelecem em ambos os fragmentos herdaram alelos de um conjunto reduzido de árvores remanescentes com maior probabilidade de união de alelos idênticos por descendência. Segundo os planos de manejo das duas reservas, ambas sofreram extração de madeira, principalmente na década de 70, restando um número reduzido de exemplares adultos de *M. multifida*. Os valores de  $f$  para adultos (média = 0,100) e jovens (média = 0,299) encontrados nas populações dos dois fragmentos indicam que atualmente os níveis de endogamia encontram-se elevados, corroborando a hipótese de que os jovens são gerados a partir de um conjunto menor alelos que permaneceram nas populações após o processo de extração. Outra explicação para o valor de  $f$  alto seria o cruzamento entre indivíduos agregados devido à dispersão em pequena escala, fenômeno observado na Amazônia para a *M. huberi* com base em análises genéticas (Azevedo *et al*, 2007). Mesmo nos adultos, os valores de  $f$  foram elevados, o que demonstra processos naturais de endogamia (desvios de panmixia) num passado remoto. Isto é consistente com o histórico de perturbações na Mata Atlântica brasileira que datam desde os primeiros séculos da colonização.

Outros estudos confirmam processos semelhantes para *Prunus africana* na floresta de Kakamega no Quênia revelando aumento da endogamia entre os jovens ( $f$ : média = 0,29) que representam o período pós-fragmentação em relação aos adultos (Farwiget *al*, 2008) e para *Swietenia macrophylla* na Amazônia brasileira que também revelou um aumento de endogamia das árvores adultas ( $f = 0,129$ ) (André *et al*, 2008).

Ainda não há relatos sobre a síndrome de dispersão da *M. multifida* e a distância percorrida pelos seus polens. Entretanto, estudos na amazônia revelam a interação da *Manilkara huberi* com abelhas dos gêneros *Melipona*, *Trigona*, *Plebeia*, *Tetrapediae*, *Augochloropsis* (Maués, 2007), todos encontrados também na Mata

Atlântica do sul da Bahia (Gonçalves & Brandão, 2008) o que sugere a possível interação de *M. multifida* com polinizadores desses gêneros. Quanto aos possíveis dispersores, existe relato de que outras espécies do gênero *Manilkara* interagem com o mico-leão-da-cara-dourada fornecendo recursos, tais como frutas e néctar (Oliveira *et al*, 2010).

Em relação à estrutura genética populacional, os resultados mostraram que a diferenciação entre adultos de diferentes fragmentos é baixa, embora significativa. No entanto, devido ao fato de a Mata Atlântica ter sido contínua no passado, é provável que o fluxo gênico tenha ocorrido entre os dois fragmentos estudados. Mas vale ressaltar a ausência de informação sobre a natureza dos possíveis dispersores e polinizadores. Se eles são capazes de estabelecer fluxo ao longo dos 145 km que separam os fragmentos. Outra alternativa seria atribuir esse resultado aos possíveis eventos de migração que ocorreram no Pleistoceno dentro do refúgio Bahia (Carnaval e Moritz, 2008). Esses eventos levaram à expansão de um *pool* gênico ancestral ao longo da Floresta Ombrófila Densa. O resultado das análises dos jovens confirma o aumento da diferenciação ao longo das gerações devido a forças evolutivas que atuam em populações de *M. multifida* contidas em fragmentos isolados de Mata Atlântica.

Desta forma, pode-se concluir que os resultados obtidos apontam para uma possível redução da variabilidade genética devido aos processos que levaram à perda de exemplares de *M. multifida* dentro dos fragmentos e que a distribuição das populações remanescentes dentro de fragmentos provavelmente tem acentuado a diferenciação genética entre as mesmas. Estes resultados juntamente com os resultados de outros estudos servirão de subsídio para compreender a dinâmica genética de árvores em fragmentos de Florestas Ombrófilas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Jiomário dos Santos Souza, José Lima da Paixão, Roberto Tarazi, Alesandro Sousa Santos e a Veracel Celulose S.A. pelo suporte no campo. A Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundo de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB), e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

## LITERATURA CITADA

ANDRÉ T., LEMES M. R., GROGAN J., GRIBEL R. Post-logging loss of genetic diversity in a mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) population in Brazilian Amazonia. *Forest Ecology and Management*. 255: 340-345. 2008.

CARNAVAL A. C., MORITZ C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*. 35: 1187-1201. 2008.

DOYLE, J. J. AND J. S. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 – 15. 1987.

FARWIG N., BRAUN C., BÖHNING-GAESE K. Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus Africana* (Rosaceae). *Conservation Genetics*. 9: 317-326. 2008.

FUCHS E. J. AND J. L. HAMRICK, Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Journal of Heredity*. 101 (3): 284-291. 2010.

GAIOTTO, F.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GONÇALVES, R. B.; BRANDÃO, C. R. F. Diversidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae) ao longo de um gradiente latitudinal na Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v.8, n. 4, p. 51-62, 2008.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3.2. Website <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. 2002.

HOLDEREGGER R., KAMM U., FELIX G., Adaptive vs. neutral diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*. 21: 797-807. 2006.

HOLSINGER K. E., WEIR B. S. Genetic in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F<sub>ST</sub>*. *Nature Reviews Genetics*.10: 639-650. 2009.

KUKACHKA, B. F. Wood anatomy of the neotropical Sapotaceae: XX. *Manilkara*. Madison, Wis. FPL. p. 14. 1981.

LOPES, A. V., GIRÃO L. C., SANTOS B. A., PERES C. A., TABARELLI M. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. *Biological Conservation*. 142: 1154-1165. 2009.

MARTINI, A. M. Z., FIASCHI P., AMORIN A. M., PAIXÃO J. L., A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiversity Conservation* 16: 3111-3128, 2007.

MESQUITA, C. A. B. Exploração madeireira no sul da Bahia: situação atual e perspectiva. *Revista dos Mestrados em Direito Econômico da UFBA. Edição Especial de Direito Ambiental*, p. 121-135. 1997.

O'BRIEN, J. P. *Manilkara multifida*. In IUCN 2011.IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. 1998.

OLIVEIRA, L. C.; HANKERSON S. J.; DIETZ J. M.; RABOY B. E. Key tree species for the golden-header Lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. *Animal Conservation*. 13: 60-70, 2010.

PARDINI, R.; SOUZA S.M.; BRAGA-NETO R.; METZGER J. P. The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biological Conservation*. 124: 253-266, 2005.

PARDINI, R. et al. The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: A multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in an agro-forestry

mosaic in southern Bahia. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1178-1190, 2009.

PENNINGTON, T. D. Flora Neotropica, monographyes. New York Botanical Gardens.52: 1-770. 1990.

SCHIERENBECK K. A., SKUPSKI M., LIEBERMAN D., LIEBERMAN M. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*. 6: 137-144. 1997.

SELKOE, K. A.; TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615-629. 2006.

THOMAS, W. W. Natural vegetation types in Southern Bahia. In: PRADO, P. I., LANDAU, E. C., MOURA, R. T., PINTO, P. I., FONSECA, G. A. B., ALGER, K. (orgs.) Corredor de biodiversidade da Mata Atlântica do sul da Bahia. Publicação em CD-ROM, Ilhéus, IESB / CI / CABS / UFMG / UNICAMP. Ilhéus, 2003 CD-ROM.



## **5 CONCLUSÕES GERAIS**

Esse trabalho mostrou a perda de variabilidade genética em populações de *M. multifida* inseridas no domínio da Mata Atlântica através da análise com oito locos microssatélites. Os resultados revelam um empobrecimento da diversidade ao longo de gerações provavelmente devido às perturbações antrópicas. Comparando os dois fragmentos, pode-se observar que a estrutura genética encontrada na floresta madura não se mantém nas plantas recentemente estabelecidas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H. Conservation and the genetics of population. p. 123. 2007.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**. 16, p. 3759-3767. 2007.

BRINKMANN, B.; KLINTSCHAR, M.; NEUHUBER, F.; HÜHNE, J.; ROLF, B. Mutation rate in human microsatellites: influence of structure and length of the tandem repeat. **American Journal of Human Genetics**. 62, p. 1408-1415. 1998.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**. 28, p. 1040-1050. 2006.

CHAMBERS, G. K.; MacAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 126, p. 455-476. 2000.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**. 83(1), p. 51-57. 1996.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta botânica brasileira**. 20(1), p. 13-23. 2006.

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**. 93, p. 504-509. 2004.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews**. 5, p. 435-445. 2004.

ESCUADERO, A., IRIONDO, J. M., TORRES, M. E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**. 113, p. 351-365. 2003.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 34, p. 487-515. 2003.

- FAHRIG, L. Relative effects of habitat loss and fragmentation on population extinction. **Journal of Wildlife Management**. 61(3), p. 603-610. 1997.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**. 3ª edição, p. 47. 1998.
- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of the Royal Society**. 263, p. 209-215. 1996.
- FREELAND, J. R. Molecular Ecology. **Wiley**. p. 71. 2005.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAS. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008-2010. 2011.
- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. . In: GALINDO-LEAL C.; CÂMARA I. G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C.p. 03-11. 2003.
- HARRISON, S.; BRUNA E. Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure? **Ecography**. 22, p. 225-232. 1999.
- HARTL D. L.; CLARCK A. G. Princípios de genética de populações. 4ª edição, p. 303-305, 2010.
- HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. **Nature Reviews**. 10, p. 639-650. 2009.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Tree**. 11, p. 324-329. 1996.
- KUKACHKA, B. F. Wood anatomy of the neotropical Sapotaceae: XX. *Manilkara*. Madison, Wis. **FPL**. p. 14. 1981.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**. 21, p. 1111-1115. 1993.

- LAWTON, J. H. What do species do in ecosystems? **Oikos** 71, p. 367-374. 1994.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**. 4(3), p. 203-221. 1987.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**. 44, p. 397-401. 1989.
- MAUÉS, M. M. Sistemas de polinização no dossel de uma floresta ombrófila densa na Amazônia. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.
- MESQUITA, C. A. B. Exploração madeireira no sul da Bahia: situação atual e perspectiva. **Revista dos Mestrados em Direito Econômico da UFBA**. Edição Especial de Direito Ambiental, p. 121-135. 1997.
- MONDOL, S.; NAVYA, R.; ATHREYA, V.; SUNAGAR, K.; SELVARAJ, V. M.; RAMAKRISHNAN, U. A panel of microsatellites to identify leopards and its application to leopard monitoring in human dominated landscapes. **BMC Genetics**. 10, 79. 2009.
- MONTEIRO, M. H. D. A.; ANDREATA R. H. P.; NEVES L. J. Estruturas secretoras em Sapotaceae. **Pesquisas, Botânica**. 58, p. 253-262. 2007.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal*. 3(1), p. 175-182. 1993.
- MYERS, N.; MITTERMEIER R. A.; MITTERMEIER C. G.; FONSECA G. A. B.; KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403, p. 853-858. 2000.
- O'BRIEN, J. P. *Manilkara multifida*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. 1998.
- OLIVEIRA, L. C.; HANKERSON S. J.; DIETZ J. M.; RABOY B. E. Key tree species for the golden-header Lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. **Animal Conservation**. 13, p. 60-70. 2010

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of ecology**. 87, p. 551-568. 1999.

PARDINI, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodiversity and Conservation**. 13, p. 2567-2586. 2004.

PARDINI, R.; SOUZA S.M.; BRAGA-NETO R.; METZGER J. P. The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**. 124, p. 253-266. 2005.

PENNINGTON, T. D. Flora Neotropica, monographies. **New York Botanical Gardens**. 52, p. 1-770. 1990.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TARBELET, P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Review**. 6, p. 847-859. 2005.

PRIMMER, C. R.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**. 5, p. 365-378. 1996.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Tree**. 8, p. 285-288. 1993.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining Forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**. 142, p. 1141-1153. 2009.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews**. 5, p. 63-69. 2004.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**. 2, p. 211-215. 1992.

SELKOE, K. A.; TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**. 9, p. 615-629. 2006.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL C.; CÂMARA I. G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Washinton: Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, p. 43-59. 2003.

STEHMANN, J. R.; FORZZA R. C.; SALINO A.; SOBRAL M.; COSTA D. P.; KAMINO L. H. Y. Plantas da Floresta Atlântica. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. p. 516. 2009.

STEVENS, P. F. AngiospermPhylogeny Website. Version 9. June 2008. Disponível em <<http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/>>. Acesso em 13 maio 2012.

TAMAKI, I.; SETSUKO, S.; TOMARU, N. Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors influencing the level of within-population genetic variation. **Heredity**. 100, p. 415-423. 2008.

THOMAS, W. W. Natural vegetation types in Southern Bahia. In: PRADO, P. I.; LANDAU, E. C.; MOURA, R. T.; PINTO, P. I.; FONSECA, G. A. B.; ALGER, K. (orgs.) Corredor de biodiversidade da Mata Atlântica do sul da Bahia. Ilhéus, IESB / CI / CABS / UFMG / UNICAMP. 2003 CD-ROM.

THOMAS, W. W., JARDIM J. G., FIASCHI P., MARIANO-NETO E., AMORIM A. M. Composição florística e estrutura do componente de uma área transicional de Floresta Atlântica no sul da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 32, p. 65-78. 2009.

THOMAS, W. W.; CARVALHO A. M. V.; AMORIM A. M. A.; GARRISON J.; ARBELÁEZ A. L. Plant endemism in two Forest in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**. 7, p. 311-322. 1998.

VELLEND, M.; GEBER, M. A. Connections between species diversity and genetic diversity. **Ecology Letters**. 8, p. 767-781. 2005.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**. 11, p. 413-418. 1996.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Insertion, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetic Resources**. 76, p. 227-236. 2000.